

UNTERSUCHUNGEN ÜBER ANTIGENE EIGENSCHAFTEN
VON BABESIA RODHAINI UND B. MUSCULI
IN DER IMMUNODIFFUSION,
GEGENSTROMELEKTROPHORESE UND
IMMUNELEKTROPHORESE AM MODELL DER MAUS

Kathrin Tüllmann

1976

Aus dem Institut für Vergleichende Tropenmedizin
und Parasitologie des Fachbereiches Tiermedizin
der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. J. Boch

UNTERSUCHUNGEN ÜBER ANTIGENE EIGENSCHAFTEN VON
BABESIA RODHAINI UND B. MUSCULI IN DER IMMUNO-
DIFFUSION, GEGENSTROMELEKTROPHORESE UND IMMUN-
ELEKTROPHORESE AM MODELL DER MAUS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Kathrin Tüllmann
aus
Freising

München 1976

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Tiermedizin der Universität
München

Dekan: Prof. Dr. B. Vollmerhaus

Referent: Prof. Dr. J. Boch

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. U. Lösch

Tag der Promotion: 27. Februar 1976



MEINEN ELTERN GEWIDMET

Untersuchungen über antigene Eigenschaften von
B. rodhaini und B. musculi in der Immunodiffusion,
Gegenstromelektrophorese und Immunelektrophorese
am Modell der Maus

I.	Einleitung	1
II.	Untersuchungen über Babesienantigene und ihre serodiagnostische Anwendung in der Immunodiffusion, Gegenstrom- elektrophorese und Immunelektrophorese (anhand der Literatur)	2
III.	Eigene Untersuchungen	17
	A. Material und Methoden	17
	1. Antigengewinnung	17
	2. Gewinnung der Hochimmunseren	20
	3. Serologische Methoden (Immunodiffusion, Gegenstrom- elektrophorese, Immunelektro- phorese	21
	B. Ergebnisse	24
	1. Nachweis von Antikörpern gegen Babesien im Serum immunisierter Mäuse mit Hilfe der Immuno- diffusion, Gegenstromelektro- phorese und Immunelektrophorese	24
	2. Serologische Reaktionen der somatischen und metabolischen Antigene von B. rodhaini und B. musculi in der Immunodiffusion, Gegenstromelektrophorese und Immunelektrophorese	27

3. Immunogene Wirkung der somatischen und metabolischen Antigene von B. rodhaini und B. musculi	31
---	----

IV. Besprechung der Ergebnisse	35
--	----

V. Zusammenfassung	42
------------------------------	----

VI. Literaturnachweis	45
---------------------------------	----

Lebenslauf

I. Einleitung

Die Babesiosen der Haustiere, insbesondere die der Rinder, stellen auch heute noch, trotz wirksamer Chemotherapeutika, ein Problem in der Haustierhaltung dar. Latent mit Babesien infizierte, klinisch gesunde Tiere stellen ein ständiges Erregerreservoir und somit eine ständige Infektionsquelle für andere Tiere dar, wenn der geeignete Vektor vorhanden ist. Da in der latenten Form der Infektion der mikroskopische Erregernachweis im gefärbten Blutaussstrich häufig negativ ausfällt, kommt der Serodiagnostik besondere Bedeutung zu. Der Antikörpernachweis läßt zumindest gewisse Rückschlüsse auf den Durchseuchungsgrad einer Herde zu.

Die Anwendung serodiagnostischer Methoden erfordert eine genaue Kenntnis der einzusetzenden Antigene und die Anwendungsmöglichkeit der unterschiedlichen Nachweismethoden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, somatische und metabolische Antigene von *Babesia rodhaini* und *B. musculi* auf ihre serodiagnostische Verwertbarkeit in der Immunodiffusion, Gegenstromelektrophorese und Immunoelktrophorese zu untersuchen.

II. Untersuchungen über Babesienantigene und ihre serodiagnostische Anwendung in der Immuno- diffusion, Gegenstromelektrophorese und Immuno- elektrophorese (anhand der Literatur)

Die Laboratoriumsdiagnose der Babesieninfektionen beruht auf dem mikroskopischen Erregernachweis in nach GIEMSA gefärbten Blutausstrichpräparaten. In besonderen Fällen kann auch der Übertragungsversuch auf empfängliche Tiere der gleichen Art durchgeführt werden. Epidemiologische Untersuchungen sind mit diesen Methoden vielfach nicht möglich, da die Parasiten bei chronischen Erkrankungen im Blutausstrich nicht immer nachzuweisen sind und der Tierversuch zu aufwendig ist.

Durch die Einführung neuer Methoden zur Isolierung spezifischer Gesamt- und Teilantigene und durch die Verbesserung der serologischen Techniken konnte in den letzten Jahren ein beachtlicher Fortschritt in der Babesienserologie erzielt werden.

Einen Literaturüberblick über die bisherige Entwicklung und den gegenwärtigen Stand der Serodiagnose gibt TODOROVIC (1975). HIRATO und M. (1954) beschrieben die Anwendung der Komplementbindungsreaktion zum Nachweis von Babesienantikörpern im Serum chronisch infizierter Pferde. Später wurde die Immunofluoreszenztechnik in der Serodiagnostik der Babesiosen eingeführt. Nach der Isolierung eines löslichen Babesienantigens folgten auch Präzipitationsteste und Agglutinationsteste. Der Fortschritt der Serodiagnose der Babesieninfektionen war eng verbunden mit der erfolgreichen Isolierung und Fraktionierung spezifischer Antigene, welche einen spezifischen und empfindlichen Antikörper-

nachweis ermöglichen. Die Herstellung reiner Babesienantigene wird allerdings durch die intraerythrozytäre Entwicklung des Parasiten und den damit verbundenen Schwierigkeiten der Isolierung aus den Wirtszellen kompliziert (FIFE, 1972; MAHONEY, 1972). Das Fehlen eines geeigneten Kulturmediums zur Antigengewinnung in vitro stellt eine weitere Schwierigkeit in der Herstellung ausreichender Antigenmengen dar.

Aus der umfangreichen Literatur der Babesien-serologie wurden die Arbeiten ausgewählt, die sich mit der Herstellung und Analyse löslicher Babesienantigene und ihrer serodiagnostischen Anwendung zum Nachweis präzipitierender Antikörper befassen.

RISTIC und SIBINOVIC (1964) isolierten ein lösliches Antigen aus dem Hämolyolat frisch mit B. caballi infizierter Pferdeerythrozyten mit der von RISTIC und MANN (1962) für die Herstellung eines löslichen Anaplasmaantigens beschriebenen Methode. Nach Hämolyse der gewaschenen Erythrozyten mit Ultraschall und Abtrennung des Sediments wurde der Überstand mit Protaminsulfat ausgefällt. Das Präzipitat wurde homogenisiert und der durch Ultrazentrifugation gewonnene Überstand als sogenanntes Protaminsulfat-(PS)-Antigen in der Immunodiffusion verwendet. SIBINOVIC und M. (1966) untersuchten dieses PS-Antigen und fanden als wesentliche Bestandteile Mucoproteine. Papierelektrophoretisch ergaben sich 2 Substanzen, die im Kontrollantigen aus nicht infizierten Erythrozyten fehlten. Nach dem Abkochen des Antigens fiel ein serologisch inaktives Präzipitat aus. Der Überstand blieb serologisch aktiv, wurde als BPS-Antigen bezeichnet und bestand aus Polysacchariden. Die im Agargel ausgebildeten Präzipi-

tationsmuster lassen das BPS-Antigen als eigentliches Antigen vermuten, das als PS-Antigen mit 2 Proteinkomponenten mit unterschiedlicher Diffusionsgeschwindigkeit verbunden ist. Beide Antigene reagierten im Test spezifisch mit Seren von Pferden mit akuter oder chronischer Babesiose.

Zur Diagnose der Hundebabesiose übernahmen POPOVIC und RISTIC (1970) diese von RISTIC und SIBINOVIC (1964) beschriebene Methode der Antigenherstellung. Als Antigenquelle verwendeten sie hämolysierte, frisch mit *B. canis* infizierte Hundeerythrozyten, die sie ebenfalls mit Protaminsulfat präzipitierten. Sie erhielten ein wirksames *B. canis*-Antigen, das bei der Austestung im Geldiffusionstest mit gleicher Intensität mit den Seren frisch und latent infizierter Hunde spezifisch reagierte.

GOLDMANN und BUKOVSKY (1975) stellten auf der Suche nach ausreichenden Antigenmengen für einen praxisnahen Präzipitationstest löslichen Rohextrakt aus allen Phasen eines mit *B. bigemina* infizierten Rinderblutes her. Das Antigen wurde sowohl von Plasma und Hämolysat durch Elution an der DEAE-Säule und anschließender Präzipitation mit Natriumsulfat als auch von gewaschenem Parasiten-Erythrozytenstroma, nach Sprengung der Zellstrukturen durch Ultraschallbehandlung oder mehrmaliges Frieren und Tauen, gewonnen.

Bei Überprüfung der Antigene im Diffusionstest reagierten nahezu alle Antigenfraktionen einer Blutprobe gleich intensiv und spezifisch. Die Autoren vermuten daher, daß die Aktivität der Antigene auf denselben Ursprung im Parasiten zurückgeht und die unterschiedliche Lokalisation auf einfachen Diffusionsvorgängen während der Infektion und nach Ab-

nahme und Behandlung des Blutes beruht. Da das B. bigemina-Antigen die gleiche Temperaturstabilität wie das von RISTIC und SIBINOVIC (1966) erhaltene B. caballi-Antigen aufweist, wird eine ähnliche biochemische Struktur der Antigene vermutet.

VICAINO und TODOROVIC (1973) isolierten ein lösliches Antigen aus hämolysierten Erythrozyten von jeweils akut mit B. bigemina und B. argentina infizierten Rindern. Sie reinigten das Antigen von wirtseigenen Substanzen durch säulenchromatographische Auftrennung des Rohextrakts an Sephadex G 200 mit der von GOODGER (1971) beschriebenen Methode. Sie konnten mit den gereinigten Antigenfraktionen sowohl speziesspezifische als auch gattungsspezifische Antigene bei beiden Rinderbabesien nachweisen.

RISTIC und M. (1971) untersuchten die antigenen Eigenschaften der beiden Hundebabesien, B. canis und B. gibsoni. Sie isolierten dabei das Antigen aus den mit den betreffenden Babesienarten infizierten Erythrozytensuspensionen. Die Antigenherstellung erfolgte ohne Wasser- oder Saponinhämolyse durch mehrmaliges Frieren und Tauen der gewaschenen Erythrozyten und anschließender Homogenisierung. Das Homogenisat wurde zur Entfernung des Hämoglobins in PBS-Puffer gewaschen und anschließend abzentrifugiert. Nach 5maliger Behandlung wurde der lösliche Anteil durch Ultrazentrifugation (39.000 Upm) abgetrennt. Bei Ansatz in der Immundiffusion mit homologen und heterologen Antiseren zeigte sich eine starke Reaktion zwischen dem B. gibsoni-Antigen und dem Antiserum gegen B. canis, die im umgekehrten Ansatz (B. canis-Antigen gegen B. gib-

soni-Antiserum) nicht auftrat.

Mit Hilfe der Gelpräzipitation fanden die Autoren durch Analyse der Präzipitationsmuster, daß *B. gibsoni* neben einem speziesspezifischen Antigen auch ein gemeinsames Antigen mit *B. canis* besitzt.

Eine serologische Verwandtschaft stellten LYKINS und M. (1975) auch zwischen *B. microti* und *B. canis* fest. Bei *B. microti* handelte es sich um einen aus dem ersten menschlichen Babesienfall isolierten Stamm (RISTIC und M., 1971). Das in der Untersuchung verwendete *B. microti*- und *B. canis*-Antigen wurde auf die von RISTIC (1968) beschriebene Weise isoliert. Der Ansatz der Antigene mit den entsprechenden homologen und heterologen Antiseren in der Immunodiffusion ergab jeweils eine identische Präzipitationsbande in allen Ansätzen. *B. canis* ist also mit dem aus dem Menschen isolierten *B. microti*-Stamm serologisch verwandt, zumindest ist ein gemeinsames lösliches Antigen in beiden Parasiten vorhanden. Es wird vermutet, daß eine ähnliche antigene Verwandtschaft auch zwischen anderen Nager-, Rinder- und Pferdebabesien besteht und somit eine potentielle Gefährdung der ländlichen Bevölkerung in babesien-endemischen Gebieten gegeben ist.

Schon seit längerer Zeit wurden antigene Substanzen im Serum frisch infizierter Tiere, z.B. bei Affen mit akuter *P. knowlesi*-Infektion sowie bei Ratten mit akuter Trypanosomiasis (SEED, 1963) nachgewiesen. Die Autoren konnten zeigen, daß diese Antigene im Laufe der Infektion schützende Antikörper erzeugten und damit lösliche Immunkomplexe bildeten.

Auch bei Tieren mit akuter Babesiose wurden im Serum gelöste Antigene nachgewiesen und teilweise isoliert. So fanden SIBINOVIC und M. (1965) ein lösliches Antigen im Serum von Pferden, die mit *B. caballi* infiziert waren. Der Nachweis des Serumantigens gelang durch Ansatz hochparasitämischer Seren als Antigenquelle mit dem Serum latent infizierter Pferde in der Agargel-Präzipitation. Die Reaktion war bereits 10 Tage nach der experimentellen Infektion der Pferde positiv und hielt 30 Tage an. Spezifische Antikörper gegen das Serumantigen traten 3 Monate p.i. erstmals im Serum auf und waren 7 Monate nachweisbar. Die Bildung der Antikörper fiel zeitlich mit dem beginnenden Latenzstadium der Infektion zusammen, in dem eine gewisse Resistenz gegen Reinfektion eintrat.

Papierelektrophoretisch ließen sich im Serum der frisch infizierten Pferde 7 Fraktionen nachweisen, die in negativen Kontrollseren fehlten. Es reagierten jedoch nur 2 Fraktionen mit dem spezifischen Antiserum. In den übrigen zusätzlichen Fraktionen sehen die Autoren unspezifische Serumveränderungen infolge der Infektion. In einer weiteren Untersuchung wurden die Antigene im Serum akut infizierter Pferde, Hunde und Ratten mit Hilfe der Ultrazentrifugation konzentriert und durch die säulenchromatographische Auftrennung an verschiedenen Medien von Serumrestbestandteilen gereinigt (SIBINOVIC und M., 1967a). Die Antigene konnten so von Lipiden, Lipoproteinen, Albumin und Hämoglobin sowie von der alpha-Globulinfraktion und größeren Anteilen der beta- und gamma-Globulinfraktionen getrennt werden. Die so erhaltenen Serumantigene der drei Tierarten wurden mit Gradientenzentrifugation in 2 weitere Fraktionen (A und B) getrennt. Fraktion A lag in der 25% Sukrose-

zone, wanderte im elektrischen Feld mit der Geschwindigkeit eines gamma-Globulins und hatte die in der analytischen Ultrazentrifugation ermittelte Sedimentationskonstante von 8 S (SVEDBERG).

Fraktion B in der 40% Sukrosezone verhielt sich elektrophoretisch wie ein beta-Globulin und hatte die Sedimentationskonstante von 20 - 29 S je nach Tierart. Bei beiden Fraktionen handelte es sich um komplexe Verbindungen aus Lipiden, Peptiden, Phosphatiden und Polysacchariden. Die serologische Spezifität der Antigene wurde in der Immunodiffusion durch Ansatz mit homologen und heterologen Antiseren der drei Tierarten geprüft. Die Fraktionen reagierten mit der gleichen Intensität mit allen Antiseren. Mit Hilfe der Präzipitationsmuster ließ sich feststellen, daß die Fraktionen A der drei Tierarten identisch waren, ebenso die Fraktionen B, jedoch stellten die Fraktion A und die Fraktion B unterschiedliche Antigene dar.

SIBINOVIC (1966) immunisierte Hunde mit dem Serum-Gesamtantigen von *B. canis*. Die Immunisierung schützte die Hunde für einen Zeitraum von 9 Monaten gegen eine Belastungsinfektion mit diesem Parasiten. Ferner konnte gezeigt werden, daß die an beta-Globulin gebundene Fraktion von *B. canis* sowohl Hunde wie Ratten gleichermaßen vor einer Belastungsinfektion mit dem spezifischen Parasiten schützte. Denselben Effekt hatten die in den homologen Tierarten gewonnenen Antiseren, die die Tiere 45 Tage vor einer Belastungsinfektion mit dem entsprechenden Parasiten schützten (SIBINOVIC und M., 1967 b). Die Autoren glauben, daß die im akuten Stadium der Erkrankung entstehenden Serumantigene, speziell die der Fraktion B, schützende Antikörper erzeugen, die sich mit den Antigenen im Serum zu löslichen Immunkomplexen

verbinden und so durch Kontrolle der Vermehrung des Erregers zu einer Infektionssterilität führen. Aufgrund der von CORWIN und M. (1965) und COX (1966) durchgeführten Arbeiten wird angenommen, daß ein gleicher Mechanismus auch bei Plasmodien-Infektionen wirksam ist und die Serumantigene dieser Parasiten serologisch sehr ähnlich oder sogar identisch mit den Serumantigenen der Babesien sind. So konnten COX (1968) und COX und MILAR (1968) zeigen, daß die Serumantigene von frisch mit *P. berghei* infizierten Ratten, ebenso wie mit *B. rodhaini* infizierten Ratten und Enten mit einer akuten *P. lophurae*-Infektion mit den homologen und heterologen Antisera von latenten Parasitenträgern in der Immunodiffusion reagierten. Dabei bildeten sich identische Präzipitationsbanden zwischen *P. berghei* und *B. rodhaini* aus. Die in den Tests verwendeten Antigene waren nach der von SIBINOVIC und M. (1967) beschriebenen Methode durch Ultrazentrifugation und Präzipitation mit Ammoniumsulfat gewonnen worden.

Der erstaunliche Mangel der Spezifität der Serumantigene erhebt für viele Autoren die Frage nach dem Ursprung dieser antigenen Substanzen und ihrem genauen funktionellen Wirkungsmechanismus.

Um die widersprüchliche Funktion der Serumantigene zu klären, untersuchten SIBINOVIC und M. (1969) die Wirkung der Serumantigene auf parasitierte und intakte Erythrozyten. Mit Hilfe der Immunfluoreszenz konnten sie zeigen, daß die an beta-Globulin gebundene Fraktion B in Ratten bereits wenige Minuten nach der Infektion an die Erythrozyten gebunden wurde und diese antigensensibilisierten Erythrozyten sehr schnell aus dem Blutkreislauf entfernt wurden.

In diesen Untersuchungen gelang auch der Nachweis des Serumantigens im Zytoplasma der infizierten Erythrozyten. Dabei war die Fluoreszenz in Erythrozyten mit jungen Parasitenstadien auf die Parasiten selbst beschränkt, während Erythrozyten mit älteren Stadien oder Teilungsformen eine diffuse Fluoreszenz des gesamten Zytoplasmas und eine intensive Fluoreszenz der Zytoplasmamembran der Erythrozyten aufwiesen. Die Antigene sind daher nach Meinung der Autoren Stoffwechselprodukte junger Parasitenstadien, die während der Entwicklung der Parasiten in das Zytoplasma diffundieren und sich an der Oberfläche der Erythrozyten anreichern. Dieselbe typische Fluoreszenzanfärbung erhielten auch MAHONEY und GOODGER (1972) bei der Untersuchung von B. argentina infizierten Rindererythrozyten mit dem Indirekten-Fluoreszenz-Antikörper-Test.

Infizierte Erythrozyten oder die durch Ultraschall isolierten Parasiten selbst agglutinierten mit den spezifisch gegen die Serumantigene gerichteten Immunglobulinen. Infektionsversuche mit diesen Erythrozyten blieben negativ. Dagegen mußten babesienhaltige Erythrozyten in natürlicher Verdünnung 60 Minuten lang mit den spezifischen Immunglobulinen inkubiert werden, bis die Babesien ihre Infektiosität verloren hatten, wobei auch eine unspezifische Denaturierung der Erythrozyten in diesem Zeitraum den Infektionsverlust mit beeinflussen konnte. Die Autoren vermuten, daß die Aktivität der spezifischen Antikörper mehr gegen die veränderten Erythrozyten gerichtet ist als gegen die Parasiten selbst. Das würde aber bedeuten, daß auch der Ursprung der Serumantigene mehr in den veränderten Erythrozyten zu suchen ist. Es konnte bis heute nicht geklärt werden, inwieweit diese antigenen Substanzen auf den Parasiten selbst zurück gehen oder Veränderungen der

infizierten Wirtszelle an ihrer Entstehung beteiligt sind.

Wie schwierig die Isolierung und Analyse der Serumantigene ist, zeigt eine Arbeit von MAHONEY und GOODGER (1969). Bei der Serumuntersuchung hochparasitärischer Rinder mit akuter *B. argentina*-Infektion wiesen sie mit Hilfe eines spezifischen Antiserums zwei Serumkomponenten nach, die im Normalserum fehlten. Beide waren aber wirtseigenen Ursprungs. Eine Substanz erwies sich identisch mit Rinderfibrinogen, die zweite stellte ein makromolekulares Auto-Antigen dar, das auch in einem Kalb mit chemisch induzierter Anämie nachgewiesen wurde. Die Isolierung eines spezifischen Serumantigens gelang MAHONEY und GOODGER (1972) durch die Immunisierung von Kälbern mit dem Gesamtplasma, das von Kälbern mit frischer *B. argentina*-Infektion stammte. Sie konnten dabei 3 unterschiedliche antigene Substanzen aus dem Serum isolieren. Zwei dieser Antigene waren wiederum Auto-Antigene, ein polymeres Haptoglobulin und ein Rinderblutgruppen-Antigen. Sie erzeugten präzipitierende Antikörper, die aber nicht spezifisch für eine Babesieninfektion waren. Das dritte Antigen rief dagegen Bildung spezifischer *B. argentina*-Antikörper hervor und schützte die entmilzten Kälber gegen eine Belastungsinfektion mit *B. argentina*. Im Gegensatz zu den von SIBINOVIC und M. (1967 b) isolierten Serumantigenen von Pferd, Hund und Ratte, die eine schützende Wirkung gegen homologe und heterologe Babesienarten gezeigt hatten, waren die von *B. argentina*-Serumantigen erzeugten Antikörper stammspezifisch. Sie erzeugten in Kälbern bei Belastungsinfektionen mit einem heterologen Stamm nur einen teilweisen Schutz, der vor allem in einer Verlängerung der Präpatenzzeit um 1 - 3 Tage

bestand. Ein vollkommener Schutz, der sich durch das plötzliche, schnelle Verschwinden der Parasiten aus dem peripheren Blut zeigte, wurde nur dann erreicht, wenn die Belastungsinfektion mit dem homologen Babesienstamm durchgeführt wurde, d.h. daß das zur Immunisierung verwendete Plasma und die Parasiten der Challenge-Infektion aus ein und derselben Blutprobe stammten.

Die serodiagnostische Anwendung der Babesienantigene in der Immunodiffusion wird heute hauptsächlich als Doppeldiffusion ausgeführt. Dabei wandern das in Agargel verbrachte Antigen und der Antikörper aufgrund unterschiedlicher Molekulargrößen unterschiedlich schnell gegeneinander. An der Zone des Zusammentreffens bilden dabei die sich entsprechenden Antigen-Antikörperfraktionen Präzipitationslinien aus (OUCHTERLONY, 1965). Der Geldiffusionstest bietet somit die Möglichkeit, zwischen speziesspezifischen und gattungseigenen Antigenen zu unterscheiden. Da er einfach auszuführen ist und keinen großen technischen Aufwand erfordert, wird er auch für die Routinediagnose in kleinen Laboratorien eingesetzt.

Seit der Einführung der Gel-Präzipitation in die Babesien-serologie durch RISTIC und SIBINOVIC (1964) dient sie zum Nachweis der Babesieninfektionen und zur Analyse der Antigenstruktur dieser Parasiten.

Durch die Ausbildung identischer und teilidentischer Präzipitationsmuster konnte die Anwesenheit gleicher Antigenfraktionen in verschiedenen Babesienarten nachgewiesen werden. Ebenso war auch der Nachweis von zwei unterschiedlichen Serumantigenen in dem Serum von Pferden, Hunden und Ratten mit akuter Babesiose möglich (SIBINOVIC und M., 1967 a).

Über die Anwendung der Immunodiffusion zur Routinediagnose der Pferdebabesiose berichten SIBINOVIC und RISTIC (1964). Sie untersuchten 8 Seren von Pferden mit experimenteller *B. caballi*-Infektion, 11 Pferde mit fraglicher Infektion, die 1 Jahr mit bekannten Babesienträgern geweidet hatten, und 162 gesunde Pferde. Dabei ergab sich, daß alle Pferde mit positivem Erregernachweis im Test positiv waren, alle fraglichen Pferde reagierten ebenfalls positiv, wobei die Infektion durch Rückübertragung gesichert wurde, und die 162 offensichtlich gesunden Pferde reagierten im Test negativ. Um die Spezifität des Tests zu sichern, wurden die Seren von 179 Pferden mit nachgewiesenen anderen Infektionskrankheiten getestet, darunter auch 31 Pferde mit infektiöser Anämie. Keines dieser Seren ergab im Test eine positive Reaktion.

Nach Meinung der Autoren erwies sich der Test als genau, an die Erkrankung gebunden und spezifisch für die Diagnose der Pferdebabesiose. GOLDMANN und BUKOVSKY (1975) untersuchten die Einsatzmöglichkeit der Agargel-Präzipitation für die Diagnose der Rinderbabesiose. Sie testeten dabei 85 Rinderseren durch Ansatz mit einem löslichen Extraktantigen aus infizierten Rindererythrozyten. Der Immunfluoreszenztest wurde als Kontrolltest eingesetzt. Es reagierten dabei 63 Seren in der Immunodiffusion positiv, der Fluoreszenztest ergab 62 positive Reaktionen. Da bei einer Reihe der Seren das Ergebnis unterschiedlich ausfiel, ergab sich insgesamt allerdings nur eine 77%ige Übereinstimmung der Testergebnisse.

Die Anwendung der Immunodiffusion zur Diagnose der Hundebabesiose untersuchten POPOVIC und RISTIC (1970).

Bereits 17 Tage nach der experimentellen Infektion der Hunde mit *B. canis* konnten sie präzipitierende Antikörper nachweisen, die über einen Zeitraum von 10 Monaten gleich intensiv mit dem somatischen Testantigen aus infizierten Erythrozyten reagierten. Die als Kontrollseren eingesetzten Seren von Hunden mit Staupe, HCC und Leptospirose zeigten keine positive Reaktion, wie auch keines der negativen Kontrollseren reagierte. Die Autoren halten diesen Test für den Einsatz in der Praxis zum Nachweis der Hundebabesiose für geeignet.

Eine Verbesserung in der Auftrennung eines Antigen-gemisches und damit die Möglichkeit einer weiteren Differenzierung der Präzipitationsbanden wurde durch die Einführung der Immunoelektrophorese erreicht. Sie stellt eine Kombination von Elektrophorese und nachfolgender Diffusion in Agar gel dar. In der von SCHEIDEGGER (1955) entwickelten Objektträger- oder Mikromethode wurde sie von SIBINOVIC und M. (1965) zur Isolierung der Serumantigene von Pferden mit frischer *B. caballi*-Infektion eingesetzt. Das Serum wurde elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend der Einwirkung eines spezifischen, im Kaninchen gewonnenen Antiserums ausgesetzt. Ein Kontrollansatz mit Normalserum wurde gleichzeitig mit dem infizierten Serum aufgetrennt. Nach der Diffusion zeigt das immunoelektrophoretische Bild des infizierten Serums einen Präzipitationsbogen in typischer Ausprägung mehr als das Normalserum. Durch Absorption des Antiserums mit Pferde-Normalserum, bei der alle gegen die Serumproteine gerichteten Antikörper ausgefällt wurden, gelang es, diesen spezifischen Präzipitationsbogen selektiv darzustellen, den die Autoren auf das Serumantigen

zurückführen. Nach Trennung des antigenaktiven Serumanteils in die Fraktionen A und B konnten diese durch ihr spezifisches immunoelektrophoretisches Verhalten identifiziert werden. Durch den Ansatz der Fraktionen mit Antiglobulin vom Hund war es in der Immunelektrophorese möglich nachzuweisen, daß diese Substanzen, die sich elektrophoretisch wie ein gamma-Globulin bzw. beta-Globulin verhielten, zumindest zum Teil wirtseigene Globuline enthielten, von denen eine Trennung der Antigenfraktionen nicht gelungen war.

MAHONEY und GOODGER (1969) konnten durch Vergleich der Lage und Ausbildung der Präzipitatbögen in der Immunelektrophorese nach Absorption der Antiseren die aufgetrennten Serumbestandteile hochparasitärmischer Rinder identifizieren. Die Auftrennung des infizierten Plasmas ergab eine typische Bande nahe am Ursprung. Die Absorption des Antiserums mit Rindernormalserum - anstatt des im ersten Ansatz verwendeten Rindernormalplasmas - entfernte diese Linie vollständig. Die Analyse der Substanz zeigte, daß sie aus Rinderfibrinogen bestand. Auch eine zweite Substanz konnte mit Hilfe der Immunelektrophorese als ein Auto-Antigen identifiziert werden durch die Ausbildung eines identischen Präzipitatsbogens, der im Serum eines künstlich anämisch gemachten Kalbes nachgewiesen wurde.

Die bisherigen Berichte über die Anwendung der Immunelektrophorese zur Untersuchung spezifischer Babesienantigene zeigen, daß sie durch die feinere Auftrennung der Antigengemische und durch Absorption von einzelnen Antikörperfraktionen eine selektive Darstellung der Antigenstrukturen aus dem komplexen Babesiengesamtantigen ermöglicht und somit eine

wertvolle Hilfe in der Charakterisierung von Babesienantigenen darstellt.

Über die Anwendung der Gegenstromelektrophorese zum Nachweis von Babesieninfektionen wird in der Literatur nicht berichtet. Dieser Präzipitationstest wurde aufgrund institutseigener Versuche mit *E. histolytica* zur Untersuchung der von mir verwendeten Babesienantigene ausgewählt.

III. Eigene Untersuchungen

A. Material und Methoden

1. Antigengewinnung

Als Versuchstiere verwendete ich 20 - 25 g schwere NMRI-Mäuse aus institutseigener Zucht. Die Tiere wurden in Makrolonkäfigen bei einer Raumtemperatur von 20°C gehalten. Als Futter erhielten sie Altromin-Mäusestandarddiät und Wasser ad libitum.

Zur Antigengewinnung wurden ausschließlich männliche Tiere verwendet, da diese wegen gegenseitiger Unverträglichkeit nur für kurze Zeit in größeren Gruppen gehalten werden können. Die Immunisierung erfolgte in weiblichen Mäusen, da hier die Gruppenhaltung auch über einen längeren Zeitraum problemlos ist.

Die für die Untersuchung ausgewählten Parasitenarten waren *B. rodhaini* und *B. musculi*. Die Arten zeichnen sich durch leichte Züchtbarkeit auf Mäusen aus, wobei ihre schnelle Vermehrung in diesen Tieren und die Ausbildung hoher Parasitämien eine günstige Antigenausbeute gewährleisten. Bei Infektion mit *B. rodhaini* entwickeln die Mäuse in 6 Tagen eine Parasitämie von ca. 800 - 850% und sterben am 7. Tag p.i. Die Infektion mit *B. musculi* wird in der Regel von den Mäusen überlebt, doch bilden sich auch hier innerhalb von 10 Tagen Parasitämien von 650 - 750% aus.

Die für die Antigenernte vorgesehenen Mäuse wurden mit 0,3 ml parasitenhaltigem Mäuseblut intraperitoneal infiziert. Das Infektionsmaterial stammte von hochparasitämischen Mäusen, wobei das Vollblutantigen durch Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung auf

einen Parasitengehalt von $1 - 2 \times 10^6$ Parasiten pro Maus eingestellt wurde.

Den Infektionsverlauf kontrollierte ich durch Anfertigen von Blutaussstrichpräparaten, die nach GIEMSA gefärbt wurden, und in denen ich mikroskopisch den Promillesatz der infizierten Erythrozyten ermittelte. Auf dem Höhepunkt der Parasitämie wurden die Tiere getötet und das Blut nach dem Eröffnen des Brustkorbes und der Durchtrennung der Herzstammgefäße mit der Kapillarpipette gesammelt.

Zur Hemmung der Blutgerinnung wurde Natriumzitrat im Verhältnis 1:20 des Blutvolumens zugesetzt. Pro Maus konnte auf diese Weise 1 - 1,5 ml Blut gewonnen werden.

Zur Gewinnung des metabolischen Antigens wurde das Plasma 10 Minuten bei 3.000 Upm abzentrifugiert und bei -20°C eingefroren.

Das parasitenhaltige Zellsediment wurde zur Reinigung von anhaftenden Plasmabestandteilen 3 x in phosphatgepufferter Salzlösung PBS pH 7,2 - 7,4 gewaschen (35,6 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 2,72 g KH_2PO_4 , 175,4 g NaCl ad 20 l Aqua dest.). Die Freisetzung der Parasiten erfolgte durch Hämolyse der Erythrozyten mit Aqua dest. Das Sediment wurde dazu auf das natürliche Volumen resuspendiert und die Zellsuspension mit Aqua dest. im Verhältnis 1:9 versetzt. Nach einer Minute wurde der Isotonus der Lösung durch Zugabe von doppelt konz. PBS-Puffer, im Verhältnis des dest. Wassers, wiederhergestellt.

Das Hämolysat zentrifugierte ich 20 Minuten lang bei 20.000 Upm in der gekühlten Ultrazentrifuge, dekanthierte den Überstand und sammelte den aus Erythrozyten

und Parasiten bestehenden Bodensatz. Ein Teil der gewaschenen, abgetöteten Parasitensuspension, die ich als Gesamtantigen AI3 bzw. AIII3 verwendete, wurde an dieser Stelle für die spätere Immunisierung abgenommen.

Nach Homogenisierung des Sediments im Zellhomogenisator (Colora Meßtechnik) erfolgte die weitere Trennung des Gesamtantigens in die somatischen Teilantigene. Nach Zusatz von 1:10 PBS wurde die Suspension zur Eluierung der löslichen Bestandteile 36 Stunden im Kühlschrank auf dem Magnetomix gerührt und anschließend bei 20.000 Upm 20 Minuten getrennt.

Der gewonnene Überstand, der die löslichen Bestandteile der Parasiten enthielt, stellte das lösliche Teilantigen AI1 von *B. rodhaini* und AIII1 von *B. musculi* dar. Das Sediment aus Erythrozyten- und Parasitenhüllen wurde als zweites Teilantigen AI2 im Falle von *B. rodhaini* und AIII2 bei *B. musculi* verwendet.

Kontrollantigene aus Mäusegesamtblut, Mäuseserum, freiem Hämoglobin, Erythrozytenhüllen stellte ich von nicht infizierten Tieren her. Als Mäusegesamtblut wurden 3 ml Vollblut mit Natriumzitrat verwendet, ebenso 3 ml Mäusenormalserum. Das Hämoglobinantigen und das Erythrozytenhüllenantigen stellte ich aus dem Blut von 30 Mäusen her. Nach Abtrennung des Plasmas wurde das Sediment zur Sprengung der Zellstrukturen tiefgefroren und getaut, anschließend 30 Minuten bei 12.000 Upm abzentrifugiert und der Überstand als Kontrollantigen gegen Hämoglobin verwendet. Der Bodensatz wurde so lange in PBS gewaschen, bis der Überstand klar blieb und das Sediment hell wurde. Daraufhin zentrifugierte ich das Sediment ab (30 Minuten bei 12.000 Upm) und verwendete es als Erythrozytenhüllenantigen.

2. Herstellung der Hochimmunseren

Die Immunisierung mit den Gesamt- und Teilantigenen und den antigenhaltigen Seren von *B. rodhaini* und *B. musculi* wurde ebenfalls in NMRI-Mäusen durchgeführt.

Zur ersten Immunisierung verabreichte ich die Antigene zu gleichen Teilen mit Freund'schem Adjuvans gemischt in einer Dosierung von 0,3 ml pro Maus s.c. Als günstige Depotstelle erwies sich der mit lockerer Haut ausgestattete seitliche Brustbereich der Mäuse. Pro Antigen immunisierte ich jeweils 30 Mäuse. Nach 6 Wochen wurden alle Tiere mit den entsprechenden Antigenen geboostert. Dazu injizierte ich 0,25 ml der Antigene ohne Zusatz von Adjuvans intraperitoneal.

Da sich herausstellte, daß diese Antigenmenge nicht ausreichte, um hochaktive Immunseren herzustellen, wiederholte ich die Immunisierung der Mäuse mit einer Antigenmenge von 0,6 ml in Freund'schem Adjuvans und boosterte wiederum mit 0,3 ml Antigen i.p.

Die Gewinnung der Hochimmunseren erfolgte 2 Wochen nach der letzten Antigenapplikation. 0,5 - 0,6 ml Blut wurden aus der Schwanzvene abgenommen, für einige Stunden im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt, anschließend 2 x je 10 Minuten bei 3.000 Upm zentrifugiert und das Serum in verschließbare Plastikröhrchen eingefüllt. Die Serumproben bewahrte ich bis zu ihrer Verwendung in Portionen von 1 ml im Kühlschrank auf.

In dieser Weise stellte ich Hochimmunseren gegen die somatischen Antigene von *B. rodhaini* (JI1, JI2, JI3) und von *B. musculi* (JIII1, JIII2, JIII3) her, ebenso gegen die metabolischen Antigene von *B. rodhaini* (JII) und *B. musculi* (JIV).

In gleicher Weise erfolgte die Herstellung der Kontrollseren, durch Immunisierung mit den entsprechenden Kontrollantigenen (20 Mäuse pro Kontrolle).

3. Serologische Methoden

Zum Nachweis von präzipitierenden Antikörpern wurde der Agargel-Mikro-Präzipitationstest nach OUCHTERLONY (1965) ausgeführt. Zur Beschichtung der Objektträger verwendete ich Kunststoffrahmen, die in 2 Abschnitte für je 3 Objektträger unterteilt waren. Die Rahmen spannte ich auf dem Nivelliertisch ein und belegte sie mit den Objektträgern, die mit 0,3% Agarose beschichtet waren.

Zum Abdichten der Zwischenräume wurden die Ränder der Objektträger mit 3% Agar ausgegossen und der abgekühlte Agar vorsichtig abgehoben. Die endgültige Beschichtung erfolgte mit 1,5% Agarose, die in einer Diäthyl-Barbituratpufferlösung mit pH 8,2 und einer Ionenstärke von 0,01 hergestellt worden war.

Pro Rahmenspur wurden 11 - 12 ml der heißen Agarose aufgetragen und nach dem Erstarren für 2 Stunden im Kühlschrank gehärtet. Pro Objektträger wurden 6 Einfülllöcher für zwei Ansätze eingestanz. Die Anordnung bestand in einem Zentralloch, um das kreisförmig 5 periphere Einfülllöcher in gleichen Abständen von 8 mm angeordnet waren.

Nach der Beschickung der Platten mit den Reagentien wurden sie in einer feuchten Kammer bei 4°C aufbewahrt, und nach einer Diffusionszeit von 36 - 48 Stunden wurde das Ergebnis abgelesen. Im Anschluß daran wurden die Agarplatten zur Entfernung des überschüssigen Proteins für 2 Tage in 0,85%iger NaCl-

Lösung gewaschen, bei 37°C unter Filterstreifen getrocknet und zur besseren Darstellung der Präzipitationslinien mit Amidoschwarz 10B gefärbt.

Die Gegenstromelektrophorese (ausgeführt nach Angabe der Behringwerke für *E. histolytica*), die sich durch schnelle Präzipitatbildung und große Empfindlichkeit auszeichnet, wurde als zweiter Suchtest eingesetzt. Die Herstellung der Agarplatten geschah in gleicher Weise wie oben beschrieben. Pro Objektträger wurden im Abstand von 2,5 cm 2 Doppelreihen mit jeweils 3 Einfülllöchern gestanzt. Der gegenseitige Abstand betrug 8 mm, der Durchmesser der Löcher 4 mm. Das Antigen wurde in die Lochreihe zur Kathode eingefüllt, das Antiserum und das Kontrollserum in die anodenwärts gerichtete Lochreihe. Den Kontakt zwischen den Gelplättchen und den Pufferkammern stellte ein puffergetränktes Filterpapier her. Die Ausführung der Elektrophorese erfolgte mit einer Universal-Elektrophoresekammer der Firma Camag und mit einem Standardspeisegerät für 500 Volt derselben Firma. Die Elektrophoresedauer betrug 45 Minuten bei einem Gesamtstromdurchfluß von 8 mA pro zwei Rahmen und einer Spannung von 300 Volt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Platten zur nachträglichen Diffusion noch über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt, anschließend 48 Stunden gewässert, dann getrocknet und gefärbt.

Die Ausführung der Immunelektrophorese erfolgte in der Mikromethode von SCHEIDEGGER (1955). Die Herstellung der Agarplatten war die gleiche wie oben beschrieben. Zur Aufnahme der Antigene wurden pro Objektträger zwei seitliche Löcher ausgehoben und die Antigene in einem Volumen von 0,01 ml eingefüllt. Die Trennung der Antigene erfolgte bei einer reduzierten Spannung von 200 Volt und einem Gesamt-Stromdurchfluß von 5 mA für 60 Minuten.

Im Anschluß daran wurde der Serumtrog ausgehoben und die Immunseren eingefüllt. Nach einer 36stündigen Diffusion in der feuchten Kammer konnte das Ergebnis abgelesen werden. Die Platten wurden wieder wie oben gewaschen, getrocknet und gefärbt. Die Ausführung der Immunelektrophorese erfolgte in der gleichen Kammer und mit demselben Puffer wie die Gegenstromelektrophorese.

Die säulenchromatographische Auftrennung der Seren hochparasitärmischer Mäuse erfolgte an dem Molekularsieb Sephadex G-200. Die Herstellung des Gels, Quellen, Equilibrieren und Entlüften des Sephadex-Gels wurde nach Angaben des Herstellers ausgeführt. Das Gelbett hatte eine Höhe von 50 cm und einen Durchmesser von 2,4 cm. Als Elutionsflüssigkeit diente ein Phosphat-Puffer (ph 7,6) mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 13,6 ml/Std., 14 ml und 16 ml/Std. Die Fraktionen wurden automatisch gesammelt, anschließend gegen Aqua dest. dialysiert und lyophilisiert. Für die Anwendung in den serologischen Tests erfolgte eine 10fache Konzentrierung der Fraktionen.

Die Belastungsinfektionen der immunisierten Mäuse mit *B. rodhaini* wurden mit einer i.p. injizierten Infektionsdosis von 1×10^6 Parasiten durchgeführt. Diese Menge hatte sich in Vorversuchen als 100%ig infektiös erwiesen. Die gleiche Infektionsdosis erhielten auch nicht immunisierte Mäuse, die als negative Kontrolle dienten.

Der Infektionsverlauf wurde 24 Tage durch tägliche Kontrollausstriche und mikroskopische Auszählung der infizierten Erythrozyten überprüft.

B. Ergebnisse

Der Nachweis von Antikörpern gegen Babesien im Serum immunisierter Mäuse wurde mit Hilfe der Immunodiffusion, Gegenstromelektrophorese und Immunelektrophorese versucht. Die Serumuntersuchungen in der Immunodiffusion ergaben interessante Ergebnisse.

Zwei Wochen nach Abschluß der Immunisierung (0,3 ml Antigen in Adjuvans s.c., 0,3 ml Antigen i.p.) erhielt ich eine positive Reaktion mit dem Antiserum gegen das serumlösliche Antigen von *B. rodhaini*. Das Serum reagierte in der Diffusion mit dem Serum hochparasitämischer *B. rodhaini*-Mäuse unter Ausbildung einer einzelnen, scharf definierten Präzipitationsbande. Alle anderen Hochimmunseren zeigten zu diesem Zeitpunkt keine Reaktion. Nach der beschriebenen 2. Immunisierung der Mäuse reagierten alle Antiseren gegen die übrigen Antigenfraktionen ebenfalls positiv. Die Ergebnisse der Immunodiffusion bestätigten sich in der Gegenstromelektrophorese.

Die immunelektrophoretische Auftrennung der Hochimmunseren mit anschließender Diffusion der Antigene erbrachte keine verwertbaren Resultate.

Der Nachweis des serumlöslichen Antigens (AII) im Serum hochparasitämischer *B. rodhaini*-Mäuse gelang am 5. und 6. Tag p.i. in der Diffusion. Die Abbildung 1 zeigt die Anordnung der Hochimmunseren und der Kontrollseren mit den aufgetretenen Präzipitationslinien im Agargel. Hier zeigen sich deutlich nur spezifische Präzipitationslinien. Die Kontrollen reagierten nicht, was zu erwarten war, da die Herstellung der Kontrollantiseren gegen Mäuseblut- und Mäuseserumbestandteile in Mäusen vorgenommen worden war (Abb. 1a). In der Abbildung 1b sind die Reak-

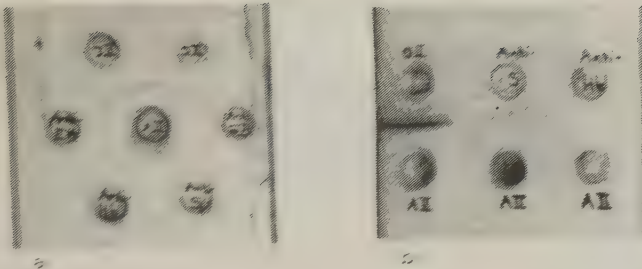


Abb. 1: Nachweis des serumlöslichen Antigens im Serum hochparasitämischer *B. rodhaini*-Mäuse in der Immundiffusion und Gegenstromelektrophorese

Erklärungen:

AI = Serum hochparasitämischer *B. rodhaini*-Mäuse

AII = Antiserum gegen AI

Anti-S = Antiserum gegen Mäusegesamtblut

Anti-Hb = Antiserum gegen Mäuseserum

Anti-EH = Antiserum gegen freies Hämoglobin

Anti-EH = Antiserum gegen Erythrozytenküllen

tionen in der Gegenstromelektrophorese dargestellt. Auch hier eine spezifische Reaktion zwischen AII und AI. Die sich andeutende Linie zwischen Anti-S und AI halte ich für nicht spezifisch. In einigen Ansätzen trat in der Diffusion eine unspezifische Reaktion des antigenhaltigen Serums mit dem Kontrollserum gegen Hämoglobin auf.

In der Immunelektrophorese reagierte das antigenhaltige Serum (AI) von Mäusen, die mit *B. rodhaini* infiziert waren, sowohl mit dem spezifischen Antiserum (AII) als auch mit dem Antiserum (AI), das gegen den wässrigen Totalextrakt (AI) von *B. rodhaini* hergestellt worden war.

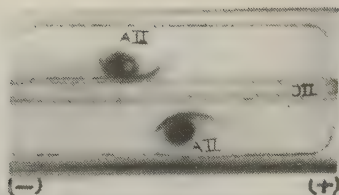


Abb. 2: Nachweis des serumlöslichen Antigens im Serum hochparasitämischer B.-rodhaini-Mäuse in der Immunelektrophorese.

Erklärungen siehe Abb. 1.

In beiden Ansätzen bildete sich eine einzelne, scharf definierte Präzipitationsbande aus. Die halbmondförmig am Ursprung liegende Bande zeigte, daß das Antigen elektrophoretisch nicht gewandert war.

In der Tabelle (Seite 27) sind die Reaktionen der Hochimmunseren mit allen löslichen Antigenen in den verschiedenen Tests zusammenfassend dargestellt. Der wäßrige Totalextrakt (AI1) von B. rodhaini reagierte mit den Hochimmunseren gegen den Totalextrakt JI1, mit dem Serum gegen die unlöslichen Bestandteile (JI2), mit dem Antiserum gegen die Parasitensuspension (JI3) sowohl in der Immunodiffusion als auch in der Gegenstromelektrophorese. Bei allen Reaktionen bildeten sich kräftige Einzelbanden im Agar gel aus, die in bezug auf Lage und Stärke nahezu identisch waren. In gleicher Weise reagierte der Totalextrakt (AI1) mit allen heterologen Antiseren (JIII1, JIII2, JIII3) gegen die B.-musculi-Antigene.

HOCHIMMUNSEREN

gegen:

ANTIGENE

		B. rodhaini				B. musculi			
		AI1	AI2	AI3	AI4	AI11	AI111	AI14	AI13
B. rodhaini	Totalextrakt (wäßrig)	+	+	+	+	+	+	+	
	Unlösliche Bestandteile	+	+	+	+	+	+	+	
	Parasitensuspension	+	+	+	+	+	+	+	
	Serumlösliches Antigen	+	+	+	+	+	+	+	
B. musculi	Totalextrakt (wäßrig)	+	+	+	+	+	+	+	o
	Unlösliche Bestandteile	+	+	+	+	+	+	+	
	Parasitensuspension	+	+	+	+	+	+	+	
	Serumlösliches Antigen	+	+	+	+	+	+	+	

Tab.: Reaktionen von B. rodhaini- und B. musculi-Antigenen mit homologen und heterologen Antisera in der Immunodiffusion (+), Gegenstromelektrophorese (o) und Immunelektrophorese (*). (Säulenchromatographisch isolierte Serumfraktionen, die in keinem der Tests reagierten, sind in der Tabelle nicht aufgeführt.)

Es bildeten sich hier ebenfalls Einzelbanden aus, die den homologen Banden sehr ähnlich waren. Gleiche Resultate erhielt ich auch mit dem wäßrigen Total-extrakt (JIIII1) von *B. musculi* mit allen homologen Antiseren und mit den heterologen Antiseren gegen *B. rodhaini*. Es zeigte sich damit eine vollständige Kreuzreaktion zwischen den Extraktantigenen von *B. rodhaini* und *B. musculi*, sowohl mit den Antiseren gegen die somatischen Antigene als auch mit den gegen das serumlösliche Antigen gerichteten Hochimmunseren (JII, JIV). In der Gegenstromelektrophorese ließen sich bis zu 3 unterschiedliche Präzipitationsbanden darstellen. Die vermehrte Anzahl der Banden trat sowohl bei homologen als auch bei heterologen Reaktionen auf, war aber nicht in jedem Ansatz in gleichem Maße reproduzierbar.

In der Immunelektrophorese konnte ich mit keinem der Extraktantigene eine Reaktion erhalten. Auch bei wiederholten Ansätzen mit unterschiedlichen Antigenkonzentrationen (Rückverdünnung: 5:1, 10:1, 20:1) ließ sich mit der beschriebenen Methode keine Präzipitation mit den verwendeten Antiseren nachweisen.

Ähnliche Ergebnisse wie mit den oben beschriebenen somatischen Extraktantigenen erhielt ich auch mit den serumlöslichen oder metabolischen Antigenen. Das Serum von hochparasitärischen *B. rodhaini*-Mäusen, im Test als AII bezeichnet, zeigte starke Reaktionen mit allen homologen und heterologen Antiseren. Es bildeten sich jeweils Einzelbanden aus, die auch nach der elektrophoretischen Auftrennung des Antigens in dieser Form auftraten. In der Immunelektrophorese reagierte das durch Lyophilisation auf 5:1 konzentrierte Serum wie das beim Nachweis beschriebene Serum in natürlicher Konzentration. Die Banden waren dabei in Ausbildung

und Lage identisch. Auch hier war keine Wanderung oder Auftrennung des Antigens zu beobachten. Das Serum infizierter B. musculi-Mäuse, im Test als AIV bezeichnet, zeigte weniger starke Präzipitationsreaktionen. Es reagierte in der Immunodiffusion und der Gegenstromelektrophorese nur mit dem homologen Antiserum (JIIII1) gegen den Totalextrakt. Außerdem zeigten sich zwei Kreuzreaktionen mit dem Antiserum (JII1) gegen B. rodhaini und dem Antiserum (JII) gegen das serumlösliche B. rodhaini-Antigen.

Aus dem Eluat der an Sephadex G-200 aufgetrennten Seren wurden jeweils 4 Fraktionen entsprechend den Elutionsgipfeln ausgewählt und serologisch getestet. Von den ausgewählten Fraktionen reagierte in beiden Seren nur jeweils eine Fraktion. Ein Vergleich mit der Elutionskurve von Normalserum zeigte, daß beide Fraktionen im Serumglobulinbereich liegen.

In Abb. 3 sind die Elutionskurven des Serums hochparasitärischer B. rodhaini-Mäuse und das als Kontrolle aufgetrennte Mäuse-Normalserum zur Deckung gebracht. So wird ersichtlich, daß die reagierende Fraktion 1 des Serums B. rodhaini-infizierter Mäuse im Globulinbereich des Normalserums liegt. Durch die säulenchromatographische Auftrennung von Seren hochparasitärischer Mäuse wird eine Reinigung und Anreicherung eines serumlöslichen Antigens in einem bestimmten Molekularbereich (Fraktion) erreicht, was sich in einer größeren Spezifität der Reaktionen äußerte.

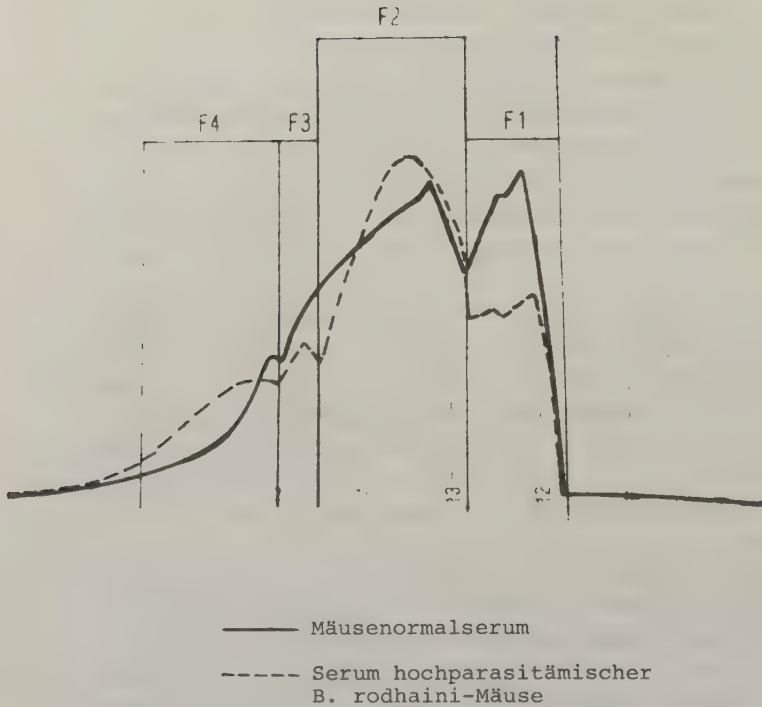


Abb. 3: Elutionskurven des Serums hochparasitämischer B. rodh.-Mäuse und des Mäusenormalserums, aufgetrennt an Sephadex G-200.

So reagierte die Fraktion 1 des B. rodhaini-Serums in allen drei serologischen Tests mit den homologen Antiseren, zeigte aber keine Reaktion mit den heterologen Seren von B. muscoli (Tab. Seite 27).

Es bildeten sich sehr scharfe, dünne Präzipitationslinien aus, die feiner und kürzer waren als die Banden des AII-Gesamtserums. Um die Lage der Fraktionen im Globulinbereich näher zu bestimmen, setzte ich sie mit Anti-Maus-Globulin vom Kaninchen in der Immunelektrophorese an. Die Fraktion 1 war dabei identisch mit den aus dem Normalserum präzipitierten Globulinbanden. Auch Fraktion 2 und 3 bildeten identische Teilbanden aus. Fraktion 4 ergab dagegen keine Reaktion mehr mit den Antiglobulinen.

Von den Serumfraktionen des B. musculi-Serums reagierte Fraktion 3 nur in der Gegenstromelektrophorese mit dem homologen Antiserum gegen den Totalextrakt, mit dem auch das Gesamt-AIV-Antigen reagiert hatte. Der Ansatz der Serum-Fraktionen von B. musculi mit Anti-Maus-Globulin ergab ein mit den Fraktionen von B. rodhaini vergleichbares Bild, wie die Abbildung der beiden Serumfraktionen zeigt.

Durch Belastungsinfektionen mit B. rodhaini sollte die immunogene Wirkung der Babesienantigene an den immunisierten Mäusen überprüft werden. Alle mit Serum-Antigenen immunisierten Mäuse zeigten nach der Belastungsinfektion den gleichen Infektionsverlauf wie die nicht immunisierten Kontrollmäuse. Die mit den wässrigen Extraktantigenen von B. rodhaini immunisierten Mäuse zeigten eine um 1 bis 2 Tage verlängerte Präpatenzzeit mit einem etwas verzögerten Anstieg der Parasitämie, die jedoch am 10. Tag ebenfalls 700% erreichte, am 11. Tag auf 670% zurückging und am 12. Tag zum Exitus führte.

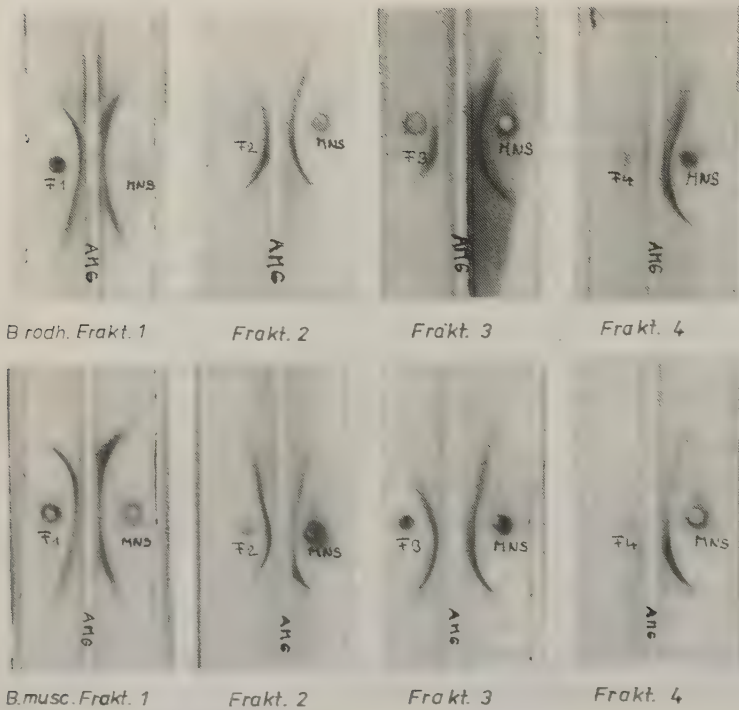


Abb. 4: Reaktionen der Serumfraktionen von *B. rodhaini* und *B. musculi* mit Anti-Maus-Globulin in der Immunelektrophorese.
MNS = Mäuse-Normalserum; AMG = Anti-Maus-Globulin

Dagegen zeigten die Mäuse, die mit den unlöslichen Bestandteilen von *B. rodhaini* immunisiert worden waren, einen gewissen Schutz gegen die Belastungsinfektion. Die Präpatenz war bei diesen Tieren ebenfalls um einen Tag verlängert. Die Parasitämie erreichte am 10. Tag gleichfalls die Höhe von 7000/100, ging jedoch am 11. Tag sehr plötzlich auf 1200/100 zurück. Zu diesem Zeitpunkt waren viele Retikulozyten im Blutaussstrich zu finden. In den folgenden Tagen ging die Parasitämie weiter zurück, so daß am 20. Tag

p.i. keine Parasiten mehr im Kontrollausstrich nachgewiesen werden konnten. Die Mäuse überlebten die Infektion.

Alle mit *B. musculi*-Antigenen immunisierten Mäuse waren für die *B. rodhaini*-Infektion voll empfänglich.

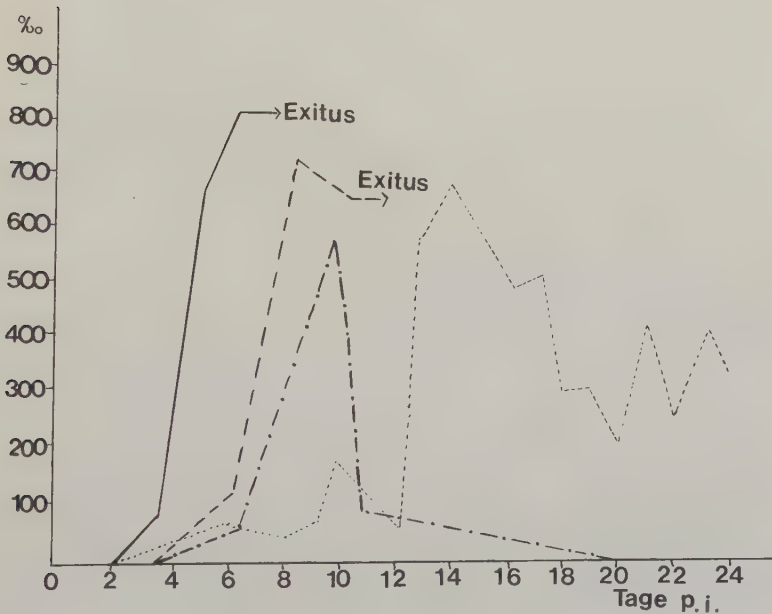


Abb. 5: Parasitämie-Verlaufskurven von mit *B. rodhaini*-Antigenen immunisierten Mäusen nach Belastungsinfektion mit *B. rodhaini* und erstmals mit *B. rodhaini* und *B. musculi* infizierten Tieren.

- *B. rodhaini* Erstinfektion
- *B. musculi* Erstinfektion
- - - immunisiert mit *B. rodhaini*-Totalextrakt
- · - immunisiert mit *B. rodhaini*-Festbestandteilen

Die Graphik soll die Parasitämie-Verläufe erstmals mit *B. rodhaini* und *B. musculi* infizierter Tiere und die nach Belastungsinfektionen immunisierter Tiere erhaltenen Verlaufskurven vergleichend anschaulich machen.

IV. Besprechung der Ergebnisse

Mit der vorliegenden Arbeit sollte der Versuch unternommen werden, somatische und metabolische Antigene von *B. rodhaini* und *B. musculi* auf ihre diagnostische Verwertbarkeit in der Immunodiffusion, Gegenstrom-elektrophorese und Immunelektrophorese zu überprüfen. Es sollte dabei auch die Möglichkeit einer serologischen Differenzierung der beiden Babesienarten untersucht werden. In Schutzversuchen wurde außerdem die immunogene Wirkung der gewonnenen Antigene an immunisierten Tieren bestimmt.

In meinen Untersuchungen konnte ich bei der *B. rodhaini*-Infektion in der Maus ein serumlösliches Antigen in dem Stadium der Infektion nachweisen, in der eine große Anzahl der Erythrozyten von Parasiten befallen war. Dieses Ergebnis stimmt allgemein mit den in der Literatur berichteten Untersuchungen überein. So wiesen SIBINOVIC und M. (1965) ein serumlösliches Antigen bei Pferden mit akuter *B. caballi*-Infektion und MAHONEY (1966) ein lösliches Antigen im Serum hochparasitärmischer Rinder mit *B. argentina*-Infektion nach. Übereinstimmend wird in beiden Untersuchungen berichtet, daß das Auftreten des Antigens an das akute Stadium der Infektion gebunden war. Nach SIBINOVIC und M. (1969) kommt es in diesem Stadium zu einer Anreicherung von Stoffwechselprodukten der Parasiten in den infizierten Erythrozyten und zur Diffusion dieser antigen wirkenden Substanzen in das Serum. Ungeklärt ist dabei, ob die für den Nachweis erforderliche Menge des Antigens allein von der hohen Anzahl der Parasiten abhängt oder ob die Freisetzung des Antigens an bestimmte Entwicklungsstadien des Parasiten gebunden ist. Da trotz relativ hoher Parasitämie (bis 700%) in meinen Versuchen der Nachweis des Antigens

im nativen Serum von mit *B. musculi* infizierten Mäusen nicht gelang, scheinen auch die Virulenz des Erregers oder seine schnelle Vermehrung für den Antigennachweis eine Rolle zu spielen. Nach Untersuchungen an Trypanosomen wird angenommen, daß es bei der langsamen Vermehrung wenig pathogener Arten zu einer Neutralisation des Antigens durch das RES kommt (D'ALESSANDRO, 1972). Ich konnte keine Angaben über gleiche Untersuchungen an Babesien finden, doch ist anzunehmen, daß ein ähnlicher Mechanismus auch bei diesen Protozoen besteht.

MAHONEY und GOODGER (1972) kommen zu der Überzeugung, daß es sich bei den freien Antigenen um hochaktive Substanzen handelt, von denen der größte Teil an Serumproteine gebunden wird und so dem Nachweis entgeht. Leider finden sich in der Literatur keine Angaben über vergleichende Untersuchungen unterschiedlich virulenter Babesienarten, die zur Klärung dieser Frage beitragen könnten.

In der Immunoelektrophorese zeigte das serumlösliche Antigen keine Wanderung im elektrischen Feld. Ebenfalls nur eine geringe Wanderung beobachteten MAHONEY und GOODGER (1972) bei der immunoelektrophoretischen Auftrennung von Rinderseren. Auch SIBINOVIC und M. (1967) wiesen nur eine geringe Wanderung von ca. 1 mm des Antigens im Serum von Pferden, Hunden und Ratten nach. Auch die Ausbildung einer einzelnen Präzipitationsbande bei der Auftrennung des Gesamtserums wird übereinstimmend berichtet (MAHONEY und GOODGER, 1972; SIBINOVIC und M., 1967a, 1967b). Aufgrund der geringen Wanderung im elektrischen Feld ist in der Immunoelektrophorese eine Trennung der antigenen Proteinfractionen zumindest bei einem pH-Wert von 8,2, 8,6 und 8,9 von Babesien nicht zu erreichen.

Die Analyse der wäßrigen Gesamtextrakte deckte 3 Partialantigene auf, die allerdings nur in der Gegenstromelektrophorese gefunden wurden. Die Ausbildung einzelner breiter Banden in der Immunodiffusion führte auf eine erschwerte Diffusion der Proteine im Agargel in dem sehr komplexen Gemisch des Extraktes zurück. Dagegen war die Trennung der Proteinfractionen in der Gegenstromelektrophorese gut. Aus den sehr klar gezeichneten, deutlich getrennten Banden war zu ersehen, daß mit dieser Methode auch die Auftrennung relativ hoher Extrakte möglich ist. Sie erwies sich damit gegenüber der Immunodiffusion als genauer und empfindlicher und war auch aufgrund der Zeitersparnis rationeller als Suchtest einzusetzen.

Die Ergebnisse der serologischen Untersuchung der Extraktantigene haben gezeigt, daß mit ihnen keine Differenzierung der beiden Babesienarten möglich ist. In allen Ansätzen reagierten die Extrakte gleich intensiv mit den homologen und heterologen Seren gegen die Teilantigene beider Arten. Es ergab sich dabei eine weitgehende Übereinstimmung der Präzipitationsbanden. Auch die in der Gegenstromelektrophorese erhaltenen Banden konnten nicht zur Unterscheidung herangezogen werden, da sie sich nahezu identisch auch in den heterologen Ansätzen zeigten. Die Kreuzreaktionen lassen sich wahrscheinlich auf gemeinsame Antigenbestandteile zurückführen. Eine sichere Aussage, inwieweit gemeinsame spezifische Teilantigene in beiden Babesienarten vorliegen oder inwieweit die Reaktionen eine Antwort auf das im Extrakt enthaltene Wirtsmaterial darstellen, läßt sich aufgrund dieser Ergebnisse nicht machen. Dabei scheint das Resthämoglobin, das trotz sorgfältiger Reinigung der Antigene nicht vollständig entfernt werden konnte, für unspezifische

Banden verantwortlich zu sein, wie die vereinzelt aufgetretenen Reaktionen der Extraktantigene mit den Kontrollseren gegen Hämoglobin zeigten.

Literaturangaben zeigen jedoch, daß echte Kreuzreaktionen zwischen nahe verwandten Babesienarten häufig sind. So konnte MAHONEY (1966) zwei gemeinsame Teilantigene zwischen *B. argentina* und *B. bigemina* nachweisen. Auch LYKINS und M. (1975) sicherten ein identisches Antigen zwischen *B. canis* und *B. microti*. Außerdem konnten RISTIC und M. (1975) ein gemeinsames Antigen zwischen *B. canis* und *B. gibsoni* nachweisen. Aufgrund der Ergebnisse dieser Untersuchungen läßt sich folgern, daß auch zwischen den von mir untersuchten Arten, *B. rodhaini* und *B. musculi*, eine Antigengemeinschaft besteht.

Gleiche Ergebnisse zeigten sich auch mit den metabolischen Rohantigenen, die ja tatsächlich Serum oder Plasma hochparasitämischer Mäuse darstellen und ebenfalls Kreuzreaktionen gezeigt haben. Die schwächeren Reaktionen des serumlöslichen Antigens von *B. musculi* gehen dabei möglicherweise auf einen geringeren Antigengehalt zurück, wie die zwei Kreuzreaktionen mit *B. rodhaini* zeigen. Mit den metabolischen Rohantigenen, ebenso wie mit den Extraktantigenen, war nur ein gattungsspezifischer Antikörpernachweis möglich.

Gute Ergebnisse erbrachte die Fraktionierung der antigenhaltigen Seren hochparasitämischer Mäuse. So reagierten an Sephadex G-200 isolierte Fraktionen von *B. rodhaini* und *B. musculi* als einzige Antigene im Test streng artspezifisch. Das bedeutet, daß nach säulenchromatographischer Auftrennung eine reinere Darstellung der Antigene gelungen ist und somit ein spezifisches Antigen für die serologische Differenzierung zwischen beiden Arten isoliert werden konnte.

In der Immunelektrophorese zeigte die Ausbildung einer identischen Präzipitationslinie der Fraktion von *B. rodhaini* mit der des nicht aufgetrennten Gesamtserums, daß es zu einer Anreicherung des Antigens in dieser Fraktion gekommen war, ohne daß eine weitere Auftrennung der antigenen Substanzen stattgefunden hatte.

Der Ansatz der Fraktionen mit Anti-Maus-Globulin beweist, daß 3 der 4 Fraktionen im Globulinbereich liegen, wobei die reagierende Fraktion bei beiden Arten jeweils den Gesamt-Globulinbereich einnimmt. Dieses Ergebnis wird durch MAHONEY und GOODGER (1972) und SIBINOVIC und M. (1967a, 1969) bestätigt. Bis heute ist mit keiner Methode die Trennung der serumlöslichen Antigene von den Serum-Globulinen gelungen. Während man früher die antigenaktiven Substanzen im Serum für Auto-Antigene vom Typ der Haptoglobine hielt, die sich im Laufe der Infektion gegen die veränderten Zellen bildeten, konnten MAHONEY und GOODGER (1972) und SIBINOVIC und M. (1969) mit Hilfe der Immunfluoreszenz nachweisen, daß das Antigen auf den Parasiten zurückgeht. Der Bindungsmechanismus der serumlöslichen Antigene an die Globuline ist aber ebenso wie ihre immunogene Wirkung und ihre eigentliche Funktion in der Erzeugung von Antikörpern bis heute nicht geklärt.

Die Spezifität der serumlöslichen Antigene nach Fraktionierung wird von MAHONEY und GOODGER (1972) beschrieben. Ihnen gelang die Isolierung einer stamm-spezifischen Fraktion von *B. argentina*. Dagegen erhielten SIBINOVIC und M. (1967a, b) trotz säulen-chromatographischer Auftrennung der Seren Kreuzreaktionen mit drei verschiedenen Babesienarten.

Die Ergebnisse der Belastungsinfektion, die die immunogene Wirkung der verwendeten Babesienantigene abklären sollte, lassen folgende Schlüsse zu. Die serologisch sehr reaktionsintensiven metabolischen Antigene sowohl von *B. rodhaini* als auch von *B. musculi* zeigten in meinen Untersuchungen keine immunisierende Wirkung. MAHONEY und GOODGER (1972) erhielten bei Immunisierung mit diesem Antigen jedoch einen teilweisen Schutz in Kälbern gegenüber Belastungsinfektionen mit *B. argentina*. SIBINOVIC und M. (1967b) konnten sowohl mit dem antigenhaltigen Plasma als auch mit teilweise gereinigten Fraktionen dieses Plasmas von Pferden, Hunden und Ratten diese Tiere in gleicher Weise vor einer Belastungsinfektion mit dem entsprechenden Parasiten vollkommen schützen. Aufgrund der Literaturberichte nehme ich an, daß eine Schutzwirkung der serumlöslichen Antigene besteht. Die negativen Ergebnisse, die sich in meiner Arbeit gezeigt haben, führe ich auf eine für die Immunisierung zu geringe Menge des antigenhaltigen Materials zurück, so daß zwar Antikörper serologisch nachgewiesen werden konnten, eine protektive Wirkung im Sinne eines Immunschutzes jedoch nicht gegeben war. Auch scheint der wäßrige Totalextrakt keine immunogene Wirkung zu haben. Es zeigte sich zwar ein gewisser Schutz, der aber nicht ausreichte, die Vermehrung der Parasiten entscheidend zu unterdrücken. Zu gleichen Ergebnissen kommen auch SCHINDLER und M. (1966) bei dem Versuch, Hunde mit Extraktantigenen von *B. canis* zu immunisieren. Sie erhielten dabei in der KBR hohe Antikörpertiter, jedoch keinen ausreichenden Immunschutz. Die korpuskulären Antigene hatten in meiner Arbeit den besten immunisierenden Effekt. Auffallend war, daß die Immunisierung mit den löslichen Parasitenbestandteilen nahezu die gleiche Schutzwirkung hatte wie die Verab-

reichung des gesamten abgetöteten Parasiten. Das läßt die Vermutung zu, daß die für die Erzeugung einer Immunität wichtigen Antigene vor allem an die Zellstrukturen der Parasiten gebunden sind. Bei den mit den Festbestandteilen immunisierten Mäusen, die sich geschützt zeigten, fanden sich am 11. Tag p.i. auffallend viele Retikulozyten im Blutaussstrich. Dies deutet darauf hin, daß eine Stimulierung des RES vorlag, welche die schnelle Eliminierung der infizierten Erythrozyten zu diesem Zeitpunkt aus dem Blutkreislauf ermöglichte.

Da die mit *B. musculi*-Antigenen immunisierten Mäuse in keinem Falle einen Schutz gegen eine *B. rodhaini*-Belastungsinfektion zeigten, finden die aufgetretenen starken Kreuzreaktionen in den von mir durchgeführten Versuchen keine Bestätigung in einer Kreuzimmunität zwischen *B. rodhaini* und *B. musculi*. Es ist anzunehmen, daß trotz der aufgetretenen Kreuzreaktion eine artspezifische Immunität zwischen beiden Babesienarten besteht. Andererseits wäre es denkbar, daß die Immunisierung mit *B. musculi* gegen die stärkere Pathogenität von *B. rodhaini* nicht ausreichte.

Es sollte deshalb in weiteren Untersuchungen die Möglichkeit einer Immunisierung mit Babesien-Gesamt- und Teilantigenen geprüft werden. Insbesondere könnte die Immunisierung mit den antigenhaltigen Serumfraktionen interessante Gesichtspunkte im Hinblick auf die Schutzfunktion der serumlöslichen Antigene erbringen.

V. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden somatische und metabolische Antigene von *B. rodhaini* und *B. musculi* aus Blut hochparasitämischer NMRI-Mäuse gewonnen und auf ihre serologischen Eigenschaften in der Immunodiffusion, Gegenstromelektrophorese und Immunelektrophorese untersucht. Durch Immunisierung von Mäusen mit Gesamt- und Teilantigenen wurden Hochimmunseren gegen beide Babesienarten hergestellt.

In der Immunodiffusion und Gegenstromelektrophorese konnten präzipitierende Antikörper in allen Hochimmunseren nachgewiesen werden. Es traten starke Kreuzreaktionen der somatischen Extraktantigene mit den heterologen Immunseren der beiden Babesienarten auf. Kreuzreaktionen mit allen Antiseren zeigten auch die metabolischen Antigene von *B. rodhaini* und *B. musculi*.

Der Nachweis eines metabolischen Antigens gelang am 5. und 6. Tag p.i. im Serum hochparasitämischer *B. rodhaini*-Mäuse.

Nach der säulenchromatographischen Auftrennung der Seren hochparasitämischer Mäuse reagierte jeweils eine Fraktion spezifisch mit den homologen Antiseren der entsprechenden Babesienart, nicht jedoch mit heterologen Immunseren.

Die immunogene Wirkung der Antigene wurde durch eine Belastungsinfektion der immunisierten Mäuse mit *B. rodhaini* überprüft. Die mit den *B. musculi*-Antigenen und metabolischen Antigenen immunisierten Mäuse waren gegen die Infektion ungeschützt. Eine verlängerte Präpatenzzeit zeigten die mit dem Extraktantigen von

B. rodhaini immunisierten Mäuse. Die mit den Parasiten-Festbestandteilen und der Parasiten-Gesamt-suspension von B. rodhaini immunisierten Mäuse überlebten die Infektion.

Summary

Investigations into serological properties of antigens of Babesia rodhaini and B. musculi by means of immunodiffusion, counterelectrophoresis and immunoelectrophoresis.

The serological properties of somatic and metabolic antigens of *B. rodhaini* and *B. musculi* were investigated by means of immunodiffusion, counterelectrophoresis and immunoelectrophoresis. Hyperimmunsera were produced by immunizing mice with whole and fractioned antigens.

Precipitating antibodies were detected in all immunsera by means of immunodiffusion and counterelectrophoresis. Cross-reactions occurred between the somatic and metabolic antigens and the heterologous hyperimmunsera of the two *Babesia* species. On the 5th and 6th day after infection a soluble antigen was detected in the serum of mice with an acute *B. rodhaini* infection.

By means of column-chromatography on Sephadex G-200 a particular fraction of each of the sera of mice highly infected with *B. rodhaini* or *B. musculi* was separated which showed specific reactions only with the homologous hyperimmunsera.

The immunogenicity of the different antigens was studied by challenging the immunized mice with *B. rodhaini*. Immunization with *B. musculi* antigens and the metabolic antigen of *B. rodhaini* had no protective effect against challenge infection. Mice immunized with the extract antigen of *B. rodhaini* showed a prolonged prepatent-period, but later died. Mice immunized with non-soluble antigen and the whole parasite suspension of *B. rodhaini*, however, survived.

VI. Literaturnachweis

1. Cox, W.H., W.F. Schröder und M. Ristic (1966):
Anemia, parasitemia, erythrophagocytosis and haemagglutinins in *B. rodhaini* infections.
Ann. Trop. Med. & Parasitol. 60, 31-38.
2. Cox, W.H. und S. Patterson (1968): Serologic crossreactions of serum antigens associated with acute Plasmodia and Babesia infections.
Am. J. Trop. Med. Hyg. 17, 173-179.
3. Cox, W.H., R. Milar und S. Patterson (1968): Cross-protection immunization by Plasmodia and Babesia infections of rats and mice.
Am. J. Trop. Hyg. 17, 13-19..
4. Corwin, R.M., R.B. McGhee und B.L. Sloan (1965): Anemia in ducklings infected with malarious plasma.
J. Parasit. 51, 36-43.
5. D'Alessandro, P.A. (1972): Trypanosoma lewisi: Production of exo-antigens during infection in the rat.
Parasit. 32, 149-164.
6. Eaton, M.D. (1936): The soluble antigen in the serums of monkeys infected with Plasmodium knowlesi.
J. Exp. Med. 69, 517-532.
7. Fife Jr., E.H. (1972): Current state of serological tests used to detect blood parasite infections.
Expl. Parasit. 31, 136-152.
8. Goldmann, M. und E. Bukovsky (1975): Extraction and preliminary use for diagnosis of soluble precipitating antigen from Babesia bigemina.
J. Protozool. 22, 262-264.
9. Goodger, B.V. (1971): Preparation and assessment of purified antigens in the passive haemagglutination test for bovine babesiosis.
Aus. Vet. J. 47, 251-255.

10. Hirato, K. Ninomiya, N., Y. Uwano und T. Kutil (1945): Studies on the complement fixation reaction for equine piroplasmosis.
Jap. J. Vet. Sci. 7, 204-205.
11. Lykins, J.D., M. Ristic, R. Weisinger und D.L. Huxsoll (1975): Babesia microti: Pathogenesis of parasite of human origin in the hamster.
Expl Parasit. 37, 388-397.
12. Mahoney, D.F. (1966): Circulating antigens in cattle infected with B. bigemina or B. argentina.
Nature London 211, 422-429.
13. Mahoney, D.F. (1967): The immunization of cattle with killed B. argentina.
Expl Parasit. 20, 125-129.
14. Mahoney, D.F. (1967): Bovine babesiosis: Preparation and assessment of complement-fixing antigens.
Expl Parasit. 20, 232-241.
15. Mahoney, D.F. und B.V. Goodger (1969): Babesia argentina: Serum changes in infected calves.
Expl Parasit. 24, 375-382.
16. Mahoney, D.F. und B.V. Goodger (1972): Babesia argentina: Immunogenicity of plasma from infected animals.
Expl Parasit. 32, 71-85.
17. Ouchterlony, Ö. (1965): Gel diffusion techniques.
In: Immunchemie (15. Colloquium Ges. Phsiol. Chem.)
Springer Verlag Berlin.
18. Popovic, N.A. und M. Ristic (1970): Diagnosis of canine babesiosis by a gel-precipitation test.
Am. J. Vet. Res. 31, 3201-3204.
19. Ristic, M., D.K. Mann und R. Kodras (1963): Anaplasmosis VIII.: Biochemical and biophysical characterization of soluble Anaplasma antigens.
Am. J. Vet. Res. 24, 372-477.

20. Ristic, M. und Sibinovic (1964): Equine babesiosis: Diagnosis by a precipitin in gel and a one step Fluorescent-Anti-body-inhibition test.
Am. J. Vet. Res. 25, 1519-1526.
21. Ristic, M., J.D. Conroy, S. Siwe, G.R. Healy, A.R. Smith und D.L. Huxsoll (1971): Babesia species isolated from a woman with clinical babesiosis.
Am. Trop. Med. Hyg. 20, 14-22.
22. Ristic, M., A.R. Smith und M.G. Groves (1971): Babesia canis and B. gibsoni: Soluble and corpuscular antigens isolated from blood of dogs.
Expl Parasit. 30, 385-392.
23. Scheidegger, J.J. (1965): une micro-methode de l'immuno-electrophorese.
Immunology 7, 103-110.
24. Schindler, R., R. Wokatsch und G. Schröder (1966): Immunität und serologische Reaktionen gegen B. canis bei Hunden nach Infektion mit lebenden Parasiten und nach Immunisierung mit einem löslichen Antigen.
Z. Tropenmed. Parasit. 17, 226-240.
25. Seed, J.R. (1963): The characterization of antigens isolated from Trypanosoma rhodesiense.
J. Protozool. 10, 380-389.
26. Sibinovic, K.H., Ristic, S. Sibinovic und T.N. Phillips (1965): Equine Babesiosis: Isolation and serologic characterization of a blood serum antigen from acutely infected horses.
Am. J. Vet. Res. 26, 147-153.
27. Sibinovic, S., K.H. Sibinovic, M. Ristic und W.H. Cox (1966): Physical and serological properties of an antigen prepared from erythrocytes of horses with acute babesiosis.
J. Protozool. 13, 551-553.

28. Sibinovic, K.H. (1966): Immunologic properties of soluble antigens from blood of animals with acute babesiosis. Ph.D. Thesis, University of Illinois, Urbana Illinois.
29. Sibinovic, K.H., R. McLead, M. Ristic, S. Sibinovic und W.H. Cox (1967a): A study of some of the physical, chemical and serological properties of antigens from sera of horses, dogs and rats with acute babesiosis. J. Parasit. 53, 919-923.
30. Sibinovic, K.H., S. Sibinovic, M. Ristic und W.H. Cox (1967b): Immunogenic properties of babesial serum antigens. J. Parasit. 53, 1121-1129.
31. Sibinovic, K.H., S. Sibinovic, M. Ristic und W.H. Cox (1969): In vivo and in vitro effects of serum antigens of babesial infections, and their antibodies on parasitized and normal erythrocytes. Ann. Trop. Med. Parasit. 63, 327-336.
32. Todorovic, R.A. (1975): Serological diagnosis of babesiosis, a review. Trop. Anim. Hlth. Prod. 7, 1-4.
33. Vizaino, O.G. und R.A. Todorovic (1973): Produccion de antigenos solubles de Babesia argentina y Babesia bigemina para pruebas de inmunologia. Procced. VII. Panam. Congress of Vet. Med. and Zootechnics. Bogota, Colombia, 23-28 July 1973, 38-39.

Herrn Professor Dr. J. Boch danke ich
sehr herzlich für die Überlassung des
Themas und die jederzeit sehr großzügig
gewährte hilfreiche Unterstützung
meiner Arbeit.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. G. Weiland,
der mir bei der technischen Ausführung
der Arbeit behilflich war und mir mit
Rat und Tat zur Seite stand.

Lebenslauf

Am 19. April 1948 wurde ich als Tochter des Zahnarztes Dr. Rudolf Tüllmann und seiner Frau Marianne, geb. Braun, in Freising geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule trat ich in das Camerloher Gymnasium in Freising ein und legte dort im Juli 1968 die Reifeprüfung ab.

Im Sommersemester 1969 begann ich mit dem Studium der Tiermedizin an der Universität München, das ich im Oktober 1974 abschloß.

Seit Januar 1975 bin ich am Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie der Tierärztlichen Fakultät der Universität München mit der Anfertigung meiner Dissertation beschäftigt.

